

POLYPEPTIDES INHIBITING HEPATITIS C VIRUS INTERNAL RIBOSOME ENTRY SITE (IRES), AND METHOD FOR SCREENING SAID POLYPEPTIDES

Numéro du brevet: WO0233376
Date de publication: 2002-04-25
Inventeur: BALAKIREVA LARISSA (FR)
Demandeur PARTEUROP DEV (FR); BALAKIREVA LARISSA (FR)
Classification:
- internationale G01N
- européenne C07K14/47A1A; G01N33/569K; G01N33/576F
Numéro de demande WO2001FR03205 20011017
Numéro(s) de priorité: FR20000013303 20001017

Également publié en tant que: WO0233376 (A3)
 FR2815358 (A1)**Documents cités:** WO9423041
 WO9961613
 XP000993424
 XP000993420
 XP000993423
pour plus d'information
>>**Report a data error here****Abrégé pour WO0233376**

The invention concerns a novel method for screening recombinant polypeptides comprising at least a motif identifying mutated RNA (MRR) of a protein naturally RNA-binding, such as eIF3, said motif being capable of binding with the IRES sequence of a viral RNA molecule with affinity not lower than that of the motif (MRR) of said protein naturally binding said RNA molecule. The invention also concerns said recombinant polypeptides obtainable by the screening method for use as medicine for preventing and/or treating viral pathologies, in particular hepatitis C.

Les données sont fournies par la banque de données **esp@cenet** - Worldwide

This Page Blank (uspto)

This Page Blank (uspto)

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 815 358

(21) N° d'enregistrement national :

00 13303

(51) Int Cl⁷ : C 12 Q 1/68, C 07 K 14/435, A 61 K 38/17, A 61 P 31/
14

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 17.10.00.

(30) Priorité :

(71) Demandeur(s) : PARTEUROP DEVELOPPEMENT
Société anonyme — FR.

(72) Inventeur(s) : BALAKIREVA LARISSA.

(43) Date de mise à la disposition du public de la
demande : 19.04.02 Bulletin 02/16.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : Se reporter à la fin du
présent fascicule

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : REGIMBEAU.

(54) POLYPEPTIDES INHIBITEURS DE L'IRES DU VIRUS DE L'HEPATITE C ET PROCEDE DE CRIBLAGE DESDITS
POLYPEPTIDES.

(57) La présente invention concerne un nouveau procédé
de criblage de polypeptides recombinants comprenant au
moins un motif de reconnaissance d'ARN (MRR) muté
d'une protéine liant naturellement l'ARN, telle eIF3, ledit motif
étant capable de se lier à la séquence IRES d'une molé-
cule d'ARN viral avec une affinité supérieure ou égale à
celle du motif (MRR) de ladite protéine liant naturellement
ladite molécule d'ARN. L'invention concerne également les-
dits polypeptides recombinants susceptibles d'être obtenus
par le procédé de criblage utilisables à titre de médicament
pour la prévention et/ ou le traitement de pathologies vira-
les, notamment de l'hépatite C.

FR 2 815 358 - A1



La présente invention vise à fournir un procédé destiné au criblage de polypeptides susceptibles d'être utilisé comme médicament pour traiter l'hépatite C. Plus particulièrement, la présente invention concerne 5 un nouveau procédé de criblage de polypeptides recombinants comprenant au moins un motif de reconnaissance d'ARN (MRR) muté d'une protéine liant naturellement l'ARN, telle eIF3, ledit motif étant capable de se lier à la séquence IRES d'une molécule 10 d'ARN viral avec une affinité supérieure ou égale à celle du motif (MRR) de ladite protéine liant naturellement ladite molécule d'ARN. L'invention concerne également lesdits polypeptides recombinants susceptibles d'être obtenus par le procédé de criblage 15 utilisables à titre de médicament pour la prévention et/ou le traitement de pathologies virales, notamment de l'hépatite C.

En 1989, le virus de l'hépatite C (VHC) a été identifié comme l'agent causal de l'hépatite non-A, 20 non-B transmise par les transfusions de sang. Le VHC appartient à la famille des *Flaviridae* dans laquelle on peut citer les virus de la Fièvre Jaune, de la Dengue et de l'Encéphalite Japonaise. Le génome de ce virus enveloppé se présente sous la forme d'un simple brin 25 d'ARN contenant un cadre de lecture et deux régions non-traduites 5' et 3'.

Comme le VIH ou le virus de la grippe, le VHC est doué d'une grande variabilité. La mutation rapide de certains de ses gènes, notamment le gène de 30 l'enveloppe, permet à ce virus d'échapper au système immunitaire de l'hôte et rend le développement de vaccin problématique. La zone la plus conservée est la

région 5' non-codante (IRES -International Ribosome Entry Site) (92% d'homologie entre les souches de VHC), ce qui laisse suggérer un rôle important de cette région dans le cycle viral. En effet, cette région 5 possède une structure secondaire qui permet au virus d'initier la traduction de son ARN d'une façon cap-indépendante. Les protéines virales sont synthétisées sous forme d'un seul polypeptide-précurseur qui est ensuite clivé par des protéases cellulaires et virales.

10 A l'heure actuelle, le traitement de l'hépatite C est basée sur l'administration d'interféron (inhibition de la synthèse protéique via PKR), associé avec de la ribavirine (anologue nucléosidique). Plusieurs effets indésirables de ces deux composés proviennent du 15 caractère non-spécifique de leur action. Par ailleurs, certains génotypes de virus sont peu sensibles à ces substances, ce qui motive des recherches vers de nouveaux agents anti-viraux plus spécifiques. Parmi ceux qui sont développés, on peut citer (i) les 20 inhibiteurs d'enzymes virales, telles que les anti-protéases, les inhibiteurs de l'hélicase et de la polymérase ; (ii) les oligonucléotides anti-sens, capables de se lier au site interne d'entrée des ribosomes (IRES, pour Internal Ribosome Entry Site) et 25 ainsi d'inhiber la synthèse des protéines virales, représentent une autre classe de thérapeutiques potentielles ; cette approche a permis de démontrer clairement que l'IRES situé dans la région 5' non-codante de l'ARN du VHC peut être considérée comme une 30 cible thérapeutique attractive, car différentes études génétiques et biochimiques antérieures ont démontré que l'IRES est essentielle pour la traduction virale.

Cependant, l'utilisation des oligonucléotides *in vivo* reste assez aléatoire à cause de leur dégradation rapide par les nucléases de l'hôte et leur faible pénétration intracellulaire. Il existe donc un réel 5 besoin de développer une nouvelle classe de molécules thérapeutiques anti-virales capables de lier à l'IRES et qui ne soit pas sensibles aux nucléases.

La présente invention se propose donc de fournir un procédé de criblage de polypeptides recombinants 10 liant spécifiquement l'IRES d'ARN viral non-coiffé, tel que l'ARN viral du VHC. De tels polypeptides, aptes à reconnaître spécifiquement l'IRES d'ARN viraux sont donc susceptibles d'être utilisé comme inhibiteurs de la synthèse des protéines virales *in vitro* et *in vivo*. 15 De tels polypeptides ne présentent pas les inconvénients des molécules thérapeutiques de l'art antérieur. La présente invention porte en outre sur le polypeptide susceptible d'être sélectionné par le procédé de criblage à titre de médicament.

20 Plus précisément, le procédé de criblage de polypeptides recombinants de l'invention comprenant au moins un motif de reconnaissance d'ARN (MRR) muté d'une protéine liant naturellement l'ARN, ledit motif étant capable de se lier à la séquence IRES ou l'un de ces 25 domaines d'une molécule d'ARN avec une affinité supérieure ou égale à celle du motif (MRR) de ladite protéine liant naturellement ladite molécule d'ARN, ledit procédé comportant les étapes de :

- 30 a) clonage d'au moins le motif (MRR) de ladite protéine liant naturellement l'ARN.
- b) mutagénèse d'au moins ledit motif (MRR),

- c) expression dudit polypeptide recombinant comprenant au moins le motif (MRR) muté,
- d) détermination de l'affinité dudit motif (MRR) muté dudit polypeptide recombinant pour 5 ladite séquence IRES ou l'un de ses domaines ;
- e) sélection des polypeptides recombinants dont le motif (MRR) muté a une affinité supérieure ou égale à celle du motif (MRR) de ladite protéine liant naturellement l'ARN.

10 Par motif de reconnaissance d'ARN (MRR), on entend désigner un motif partagé par un grand nombre de protéines liant naturellement l'ARN. Parmi ces protéines, on peut citer les protéines de maturation de 15 l'ARN telles le facteur initiateur de la traduction chez les eucaryotes eIF3 (Birney E, 1993) et U₁snRNP ainsi que les régulateurs de traduction tels que la « Polyadenylate binding protein » (PABP).

La séquence consensus du MRR, d'environ 80 acides 20 aminés, est caractérisé par la présence de deux séquences très conservées RNP1 (8AA) et RNP2 (6AA). L'agencement des structures secondaires sur la séquence peptidique se fait dans l'ordre $\beta_1-\alpha_1-\beta_2-\beta_3-\alpha_2-B_4$. La structure tri-dimensionnelle de plusieurs MRR a été 25 résolue par radiocristallographie et RMN. Elle se présente généralement sous forme d'un feuillet β de quatre brins, contenant les signatures RNP-1 et RNP-2 et de deux hélices α . Ces données structurales ont permis d'identifier des domaines de la protéine 30 impliqués dans l'interaction avec l'ARN. Ainsi, les boucles $\beta_2-\beta_3$ et $\alpha_2-\beta_4$ se déplacent lors de la formation

du complexe polypeptide-ARN et par conséquent peuvent être impliquées dans l'interaction avec l'ARN. Les données obtenues grâce à la mutagenèse dirigée dans la boucle β 2- β 3 ont démontré que la taille de cette boucle 5 est importante pour la stabilité du complexe MRR-ARN (Laird-Offringa et al., 1995). Un modèle mécanistique d'interaction a été suggéré et compare la boucle protéique β 2- β 3 avec un bouton dont la taille détermine la stabilité de la fermeture.

10 Selon un mode de réalisation particulier de réalisation, ledit polypeptide recombinant selon l'invention est isolé par la technique dite « phage display » également nommée « évolution moléculaire ». Dans cette technique, la protéine d'intérêt est 15 fusionnée avec une des protéines de la capsid phagique et ainsi exposée à la surface du bactériophage. Les variations systématiques dans la séquence du gène de la protéine permettent de créer une banque des phages différents exposant à sa surface différentes formes 20 moléculaires de la protéine. L'approche a pour but de sélectionner et amplifier des particules phagiques capables de s'accrocher à un ligand sélectionné et permet de choisir les peptides capables de reconnaître spécifiquement la cible.

25 L'application la plus marquante de la technique "phage display" est la conception de nouvelles protéines aptes à interagir d'une façon spécifique avec l'ADN. Un domaine protéique nommé "doigts de zinc" apte à se lier à l'ADN peut être exposé à la surface de la 30 capsid du bactériophage et muté (Klug, 1999). Des cycles de sélection-amplification des particules phagiques capables de s'accrocher à différentes

séquences d'ADN ont permis d'exprimer des motifs "doigts de zinc" capables de reconnaître les séquences de l'ADN très spécifiquement. Plusieurs études effectuées dans ce domaine ont permis de déduire "le code de reconnaissance" reliant la séquence d'acides aminés caractéristiques des motifs "doigts de zinc" (environ 20 AA) et celle des bases d'acides nucléiques (triplets) (Wolfe et al., 1999). La combinaison de plusieurs "doigts de zinc" différents permet ainsi de concevoir rationnellement des polypeptides aptes à se lier à une séquence choisie de l'ADN.

Les nouvelles protéines ainsi conçues possèdent alors une affinité et une spécificité considérable vis-à-vis du ligand ($K_D < 2,1 \times 10^{-15} M$) (Kim et al., 1998).

La mise en œuvre de la technologie du « phage display » permet l'obtention rapide de nombreux polypeptides mutés spécifiques de la séquence IRES d'intérêt, de préférence de la séquence IRES du virus de l'hépatite C.

Par séquence IRES, on entend désigner la région 5' non traduite de certains ARN viraux (Flaviviridae, Picornaviridae, Coronaviridae) qui possèdent une structure secondaire typique qui sert de site de recrutement des ribosomes. Cette région permet aux virus concernés d'initier la traduction de leur ARN d'une façon CAP-indépendante. De préférence, ladite séquence IRES selon l'invention, ou l'un des ses domaines, est la séquence IRES d'un ARN viral. Le domaine de la séquence IRES sont de préférence choisi parmi les séquences nucléiques directement en contact avec le MRR.

Ladite séquence IRES ou l'un de ses domaines provient d'ARN viral de virus qui, au cours de leur cycle de réplication virale, mettent en œuvre une étape de traduction cap-indépendante d'une séquence d'ARN viral. De préférence, ledit virus est un virus à ARN ; de manière préférée, ledit virus est appartient à la famille des Flaviviridae, des Picornaviridae, des Coronaviridae.

Parmi les Flaviviridae, il convient de citer notamment le virus de l'hépatite C humaine (VHC), le virus de la diarrhée bovine (BVDV), le virus de la peste porcine. Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, il s'agit du virus de l'hépatite C.

Parmi les Picornaviridae, il convient de citer (i) les Entérovirus, notamment les poliovirus humains, les Coxsackievirus, les Echovirus humains, porcins et bovins ; (ii) les Rhinovirus, et notamment le virus du rhume ; (iii) les Aphtovirus, notamment le virus de la fièvre aphteuse ; (iv) les cardiovirus, notamment le virus de l'encéphalomyocardite (EMC), le virus Mengo ; (v) le virus de l'hépatite A.

Parmi les Coronaviridae, il convient de citer le virus de la gastro-entérite transmissible du porcelet, le virus de la bronchite aviaire, le virus de la diarrhée du veau, le virus de la diarrhée de l'homme, le virus de l'hépatite de la souris.

Dans le cadre de la présente invention la séquence IRES est de préférence la séquence IRES de l'ARN du virus de l'hépatite C de séquence SEQ ID N°1, et les domaines de la séquence IRES sont de préférence, la boucle IIIa de séquence SEQ ID N°2, la boucle IIIb de

séquence SEQ ID N°3, la boucle IIIc de séquence SEQ ID N°4.

Par séquence IRES au sens de la présente invention, on entend également désigner les variants 5 naturels des séquences IRES et notamment les variants naturels de la séquence IRES du VHC. Par « variant naturel », on entend désigner les séquences IRES issues du polymorphisme génétique de la population des ARN viraux ; ces variants naturels de séquence IRES n'ont 10 pas une activité substantiellement modifiée par rapport à une séquence IRES sauvage consensus.

Par domaine de séquence IRES, on entend désigner un fragment de séquence qui a la capacité de lier le motif MRR d'une protéine liant l'ARN.

15 Selon un mode préféré de réalisation, ladite protéine liant naturellement l'ARN est sélectionnée dans le groupe composé des protéines de maturation de l'ARN et des facteurs régulateurs de la traduction ; plus particulièrement, il s'agit des 20 ribonucléoprotéines snRNP et hnRNP et des sous-unités du facteur d'initiation de la traduction eucaryotique 3 (eIF3). Selon un mode particulier de réalisation, la protéine liant naturellement les molécules d'ARN est le facteur multiprotéique d'initiation de la traduction 25 eucaryotique 3 (eIF3) humain. Plus particulièrement, la protéine est la protéine P110 (eIF3_{P110}) du complexe eIF3. Les inventeurs ont mis en évidence l'aptitude de la protéine p110 à se fixer sur la séquence IRES de l'ARN viral du virus de l'hépatite C. Cette protéine 30 eIF3_{P110} se fixe spécifiquement sur la partie apicale de la région III de l'IRES du VHC et notamment sur les boucles IIIb ou IIIc (Sizova et al., 1998). D'après

l'analyse de la séquence en acides aminés, la protéine eIF3_{p110} (SEQ ID N° 5 ; N° d'accession AAB42010 dans la banque NCBI) possède un "Motif de Reconnaissance" d'ARN dans sa partie centrale (MRR). Ce domaine (SEQ ID N° 6, 5 correspondant aux acides aminés 175 à 283 de la séquence SEQ ID N° 5) est donc responsable de la fixation de la protéine eIF3_{p110} sur la boucle III de l'IRES du VHC.

Selon un mode préféré de réalisation, ledit motif 10 de reconnaissance d'ARN (MRR) est le MRR de eIF3_{p110} de séquence SEQ ID N° 6 correspondant à la séquence d'acides aminés 175 à 283 de la séquence SEQ ID N° 5 ou l'un de ses fragments ou l'un de leurs variants naturels. Par fragment du MRR, on entend désigner un 15 fragment de la séquence d'acides aminés du MRR qui conserve l'aptitude à se lier à une séquence IRES. De préférence, le fragment du MRR selon l'invention correspond à la séquence d'acides aminés 185 à 270 de la séquence SEQ ID N° 5. Par variants naturels, on 20 entend désigner les MRR présentant des variations dans la séquence du MRR par rapport à la séquence consensus sauvage, de telles variations représentant les polymorphismes rencontrés dans la population et qui ne changent pas de manière substantielle l'affinité dudit 25 MRR pour sa séquence cible.

Des mutations sont introduites dans le MRR du polypeptide de l'invention afin d'augmenter l'affinité du MRR pour la séquence IRES cible. De telles mutations sont introduites par mutagénèse aléatoire, ou par 30 mutagénèse ciblée selon des techniques connues de l'homme du métier. L'utilisation de la technique du phage display, permet d'introduire un grand nombre de

mutation de manière aléatoire dans ledit MRR et ainsi permettre d'obtenir rapidement un grand nombre de mutants à cribler.

Par mutation, on entend désigner n'importe quels 5 changements intervenus dans la séquence du MRR du polypeptide selon l'invention et notamment du MRR de eIF3_{P110}, autres que les changements correspondant à ceux des variants naturels, et qui modifient de façon substantielle l'affinité du polypeptide selon 10 l'invention à ladite séquence IRES. Parmi les mutations susceptibles d'être introduites dans le MRR du polypeptide selon l'invention, il convient de citer les mutations ponctuelles, les délétions, les insertions, les substitutions. Toutefois, il convient de 15 sélectionner uniquement les mutations introduites dans le MRR d'une protéine liant naturellement l'ARN et qui confèrent à ce MRR muté une affinité supérieure ou égale à l'affinité du MRR non muté de la même protéine liant naturellement l'ARN.

20 De préférence, les mutations introduites dans le MRR sont situées dans les motifs directement en contact avec l'ARN, c'est-à-dire de préférence dans les séquences très conservées RNP1 et RNP2, et plus particulièrement dans les boucles β 2- β 3 et α 2- β 4 des 25 MRR. Selon un mode préféré, le MRR selon l'invention est le MRR de eIF3_{P110} de séquence SEQ ID N° 6 (séquence d'acides aminés 175 à 283 de la séquence SEQ ID N° 5) ou l'un de ses fragments ou de leurs variants naturels. De préférence, il s'agit du fragment d'acides aminés 30 185 à 270 de la séquence SEQ ID N° 5 du MRR de eIF3_{P110} ; ledit MRR de eIF3_{P110}, ou l'un de ses fragments, ou leurs variants est(sont) muté(s) à au

moins une des positions suivantes de la séquence SEQ ID N° 5 :

- la valine en position 188,
- le glutamate en position 224 et 225,
- 5 - l'aspartate en position 226 et 251,
- la glycine en position 227 et 252,
- la lysine en position 228 et 248,
- la tyrosine en position 232 et 253,
- la phénylalanine en position 234,
- 10 - l'asparagine en position 249,
- l'alanine en position 250.

L'invention porte également sur le polypeptide recombinant susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'invention. Ledit polypeptide comprend au moins 15 un motif MRR. Selon un mode préféré de réalisation le polypeptide selon l'invention comprend au moins le motif minimal de reconnaissance d'ARN (MRR) fonctionnel.

Il est dans l'étendue de l'invention de réaliser 20 des protéines de fusion avec ledit polypeptide de l'invention pour améliorer par exemple la purification, la solubilité, la biodisponibilité, la durée de vie, le ciblage du polypeptide selon l'invention.

Selon un mode de réalisation préféré, le 25 polypeptide de l'invention correspond à au moins le MRR muté de eIF3_{P110} ou l'un de ses fragments ou l'un de leurs variants naturels. Plus particulièrement, le polypeptide selon l'invention comprend la séquence d'acides aminés 185 à 270 de la séquence SEQ ID N° 5 30 dans laquelle des mutations ont été introduites aux positions précédemment mentionnées.

Le polypeptide de l'invention est une protéine recombinante qui est susceptible d'interagir avec la séquence IRES des virus à ARN avec une affinité supérieure ou égale à celle des protéines cellulaires ou virales qui se lient naturellement à cette séquence lors de l'infection virale. La séquence IRES a en effet l'aptitude à former une structure secondaire en boucle (stem loop) avec laquelle le polypeptide de l'invention est susceptible d'interagir. De telles interactions sont aisément mises en évidence par l'homme du métier par des expériences de retard sur gel à ARN et/ou par des expériences de couplage aux U.V.. Le polypeptide de l'invention constitue donc un inhibiteur compétitif des protéines se liant naturellement sur la séquence IRES viral, parmi lesquelles il convient de citer eIF3. Le polypeptide de l'invention diminue ou inhibe la réPLICATION de l'ARN viral.

Le polypeptide selon l'invention est donc un principe actif destiné à être utilisé à titre de médicament et plus particulièrement à titre de médicament pour le traitement de pathologies virales impliquant un virus, qui au cours de son cycle de réPLICATION virale, met en œuvre une étape de traduction CAP-indépendante d'une séquence d'ARN. Parmi ces virus, il convient de mentionner les virus précédemment cités. De manière générale, la pathologie virale que se propose de traiter le polypeptide selon l'invention correspond à la pathologie impliquant le virus dont la séquence IRES de l'ARN, ou l'un de ses domaines, a été utilisée dans le procédé de criblage selon l'invention. De préférence, ledit virus est le virus de l'hépatite C.

C'est donc un objet de la présente invention de fournir un polypeptide selon l'invention à titre de médicament destiné à inhiber la traduction du génome viral, et ainsi empêcher sa réPLICATION. Le polypeptide 5 selon l'invention à titre de médicament est préférentiellement sous forme soluble, associés à un véhicule pharmaceutiquement acceptable. Par véhicule pharmaceutiquement acceptable, on entend désigner tout type de véhicule employé habituellement dans la 10 préparation de compositions injectables, c'est-à-dire un diluant, un agent de suspension tel une solution saline isotonique ou tamponnée. De préférence, ces composés seront administrés par voie systémique, en particulier par voie intraveineuse, par voie 15 intramusculaire, intradermique ou par voie orale. Leurs modes d'administration, posologies et formes galéniques optimaux peuvent être déterminés selon les critères généralement pris en compte dans l'établissement d'un traitement adapté à un patient comme par exemple l'âge 20 ou le poids corporel du patient, la gravité de son état général, la tolérance au traitement et les effets secondaires constatés, etc. Quand l'agent est un polypeptide, on peut l'introduire dans des tissus ou des cellules hôtes par un certain nombre de façons, 25 incluant la micro-injection ou la fusion de vésicules.

C'est donc un des objets de la présente invention d'utiliser un polypeptide comprenant au moins un motif de reconnaissance d'ARN (MRR) d'une protéine liant naturellement l'ARN pour inhiber la traduction CAP-30 indépendante d'une région codante d'une séquence IRES de ladite séquence d'ARN. Plus particulièrement, la présente invention se propose d'utiliser le polypeptide selon l'invention pour la préparation d'un médicament

destiné au traitement de pathologies virales impliquant des virus qui au cours de leur cycle de réPLICATION virale mettent en œuvre une étape de traduction CAP-indépendante d'une séquence d'ARN. Parmi ces virus, il 5 convient de citer les virus précédemment évoqués et sélectionnés parmi les Flaviviridae, les Picornaviridae, les Coronaviridae. Ledit Flaviviridae étant de préférence choisi parmi le virus de l'hépatite C, le virus de la peste porcine, le virus de la 10 diarrhée bovine. De préférence, ledit Flaviviridae est le virus de l'hépatite C.

Le polypeptide selon l'invention est utilisé pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de l'hépatite C, de la diarrhée bovine, de la diarrhée du 15 veau, de la diarrhée humaine, de la peste porcine, de la gastro-entérite transmissible du porcelet, de la fièvre aphteuse, de l'encéphalo-myocardite (EMC), de l'hépatite A, de l'hépatite de la souris, du rhume, de la bronchite aviaire.

20 Plus particulièrement, le polypeptide selon l'invention est utilisé pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de l'hépatite C.

Enfin, l'invention vise à fournir une composition pharmaceutique pour le traitement préventif et curatif 25 d'une pathologie choisie parmi l'hépatite C, de la diarrhée bovine, de la diarrhée du veau, de la diarrhée humaine, de la peste porcine, de la gastro-entérite transmissible du porcelet, de la fièvre aphteuse, de l'encéphalo-myocardite (EMC), de l'hépatite A, de 30 l'hépatite de la souris, du rhume, de la bronchite aviaire, caractérisée en ce qu'elle contient une quantité thérapeutiquement efficace d'un polypeptide

selon l'invention et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention seront mieux mis en évidence à la 5 lecture des exemples suivants.

Figure 1 : La séquence d'acides aminés du motif de reconnaissance de l'ARN (MRR) de la protéine $\text{eIF3}_{\text{p}110}$.

10 Les zones de la protéine impliquées dans l'interaction avec l'ARN et qui sont susceptibles d'être mutées sont en lettres plus grandes.

Figure 2 : Structure de l'IRES VHC

15 En agrandi, est figurée la structure du site d'interaction avec $\text{eIF3}_{\text{p}110}$.

Figure 3 : Schéma de la synthèse de boucle IIIb de l'IRES du VHC *in vitro* (Kruger et al., 20 1999)

EXEMPLESEXEMPLE 1 : Clonage et expression du fragment polypeptidique correspondant au motif MMR du eIF3_{p110}.

5

1.1 Le fragment d'ADN codant pour les acides aminés 185-270 du eIF3_{p110} (SEQ ID N° 5) et correspondant à un fragment du motif de reconnaissance de l'ARN, est amplifié par PCR en utilisant l'ADN humain extrait de 10 cellules du sang périphérique comme matrice et les amorces 5'-GGAGATATACATATGAGCCAGGAAGCAGATGGA (SEQ ID N° 7) et 5'-TCAGTGGTGGTGGTGCAGTCGACCTCGTCAGTCAT (SEQ ID N° 8). Le fragment amplifié est coupé et cloné dans le 15 plasmide pET-30B (NOVAGEN) en fusion avec His-tag sur C-terminus coupé au préalable avec *Nde*I et *Xhol*. La protéine est produite dans *E.coli* (souche BL21 LysS) et purifiée sur la colonne de Ni²⁺- NTA agarose.

20

1.2. Cytotoxicité du fragment eIF3_{p110}.

Avant d'étudier l'activité anti-virale du polypeptide, son effet毒ique éventuel est évalué par coloration avec bleu Trypan. De possibles effets indésirables (effets non spécifiques sur la synthèse 25 protéique) sont estimés en mesurant l'incorporation de la méthionine [³⁵S] dans les protéines des cellules HeLa.

30

EXEMPLE 2 :2.1 Clonage de l'IRES du VHC (40-372 nt)

L'ADNC correspondant à l'IRES du VHC minimal requis pour la traduction cap-indépendante comprenant les nucléotides 40-372 de l'ARN viral du VHC, est amplifié par RT-PCR à partir de sérum provenant de 5 patients VHC-positifs et cloné dans un vecteur pGEM-luc (Promega) sous le contrôle du promoteur T7. La transcription est effectuée *in vitro* en utilisant T7-polymérase et le plasmide linéarisé par *Nde*I.

10 **2.2. Synthèse des différentes parties de l'IRES**

Les travaux antérieurs montrent que eIF3_{p110} se fixent sur partie III de l'IRES (Sizova et al., 1998). Sachant que les domaines MRR reconnaissent des séquences ARN d'une longueur de 20 bases maximum, les 15 inventeurs ont localisé le site d'interaction plus précisément en utilisant des oligoribonucléotides correspondant aux boucles IIIa, IIIb et IIIc. A la place du clonage, les inventeurs utilisent une méthode plus rapide développée antérieurement pour les 20 ribozymes. Deux oligonucléotides chevauchant, dont un contient le promoteur de la T7 polymérase et l'autre une séquence de l'IRES, sont utilisés pour synthétiser un fragment double brin à l'aide du fragment de Klenow. Le fragment linéaire d'ADN double brin est utilisé 25 comme matrice pour la synthèse d'ARN *in vitro*. La même procédure sera utilisée pour la synthèse des boucles IIIa et IIIc (en utilisant les oligonucléotides correspondants) (figure 3).

EXEMPLE 3 : Etude de l'affinité du polypeptide pour l'ARN viral

L'affinité du polypeptide pour l'IRES est mesurée 5 *in vitro* par retard de l'ARN sur gel d'acrylamide (gel shift). L'ARN marqué par [³²P] lors de la transcription est incubé avec le polypeptide en présence de Mg²⁺ (2,5 mM) nécessaire pour maintenir sa structure tertiaire stable (Kieft et al., 1999) et déposé sur gel 10 d'acrylamide (8%). Les gels sont analysés par Phosphorimager STORM (Amersham).

EXEMPLE 4 : L'activité anti-virale du polypeptide

15

La capacité du polypeptide à inhiber la traduction IRES-dépendante est estimée *in vitro*. Le fragment de l'ADNc du VHC comprenant les nucléotides 40-372 est re-cloné en fusion avec le gène de la luciférase sous le 20 promoteur T7. L'effet du polypeptide est évalué *in vitro* en suivant l'inhibition de la synthèse de luciférase dans le lysat de réticulocytes.

25 EXEMPLE 5 : Etude structurale du complexe polypeptide-ARN

Les études par RMN du complexe polypeptide-ARN permettent d'identifier d'une façon précise les sites 30 de ces interactions et ainsi localiser des sites de mutations susceptibles d'accroître l'affinité des deux partenaires. La structure du complexe entre la protéine

et l'ARN est étudiée par RMM. Ces analyses structurales sont effectuées en parallèle avec la recherche par "phage display" qui débute à partir d'un modèle théorique. Compte tenu de la taille du domaine (environ 5 90 acides aminés), un marquage isotopique à l'azote-15 permet de cartographier ("mapper") le site d'interaction de la protéine avec la boucle d'ARN de façon simple par l'analyse des variations des déplacements chimiques des fonctions amides du 10 squelette peptidique.

EXEMPLE 6 : Mutagenèse dirigée du polypeptide et
sélection des mutants à forte affinité
15 pour l'ARN viral (« phage display »)

Afin d'obtenir une banque du fragment polypeptidique correspondant au motif MRR de eIF3_{p110}, les inventeurs utilisent le système RPAS (Amersham) 20 classiquement destiné à la construction des banques de fragments variables des anticorps. Le fragment d'ADN codant pour le polypeptide correspondant aux acides aminés de séquence 185-270 de la séquence SEQ ID N° 5 est recloné en fusion avec le gène de la protéine III 25 de la capsid du phage M13 dans un phagemide (pCANTAB 5E, Amersham). Les cellules transfectées par phagemide et infectées par phage-helper seront sélectionnées grâce à leur résistance à l'ampicilline (phagemide) et la kanamycine (phage helper). Les particules phagiques 30 produites par les cellules sélectionnées vont exprimer MRR à leur surface. La localisation extracellulaire du

MRR sera confirmée par la capacité des particules phagiques de fixer l'ARN radiomarqué.

Pour préparer la bibliothèque des mutants de MRR, chaque acide aminé de la boucle $\beta_2-\beta_3$ (5 acides aminés) 5 impliquée dans l'interaction avec l'ARN, sera "randomisé" par amplification PCR (en utilisant un oligonucléotide-amorce dans lequel chaque codon à muter sera échangé par un codon dégénéré). Ce fragment amplifié par PCR sera inséré dans un phagémide au lieu 10 du fragment "sauvage". Ainsi préparée, la bibliothèque de phagémides sera introduite dans *E. coli* et amplifiée. L'infection des cellules par phage-helper permettra la production de la bibliothèque des phages de la fusion.

15 L'ARN boucle sélectionné est immobilisé sur des billes-streptavidine à l'aide d'oligodéoxynucléotides biotinylées complémentaires. Ces billes sont utilisées pour capturer des phages exprimant des mutants des motifs MRR ayant une forte affinité pour l'ARN (la 20 sélection est effectuée en présence d'un excès d'ARNt). Des clones du phage capturés sont amplifiés et re-sélectionnés. Les clones sélectionnés au bout de 3-4 cycles sont séquencés. La comparaison des séquences permet d'identifier des acides aminés favorisant 25 l'interaction avec l'ARN-cible.

Les polypeptides correspondants sont exprimés et purifiés. Leurs affinités pour l'ARN viral, leur spécificité ainsi que la structure des complexes ARN-polypeptides sont étudiées comme décrit plus haut. La 30 même procédure est utilisée pour construire d'autres bibliothèques combinatoires en introduisant une

mutation au niveau de la boucle $\alpha_2-\beta_4$ (6 acides aminés) ou de certaines positions dans RNP1 et RNP2.

5 EXEMPLE 7 : Etude de l'affinité pour l'ARN viral des néo-polypeptides conçus

Les gènes des polypeptides ayant une forte affinité pour l'ARN viral sont clonés en fusion avec 10 His-tag, exprimés dans *E. coli* et purifiés. Leurs affinité et spécificité pour l'ARN-cible, ainsi que leur capacité à inhiber la synthèse des protéines sont étudiées *in vitro* comme décrit plus haut.

REFERENCES

Kieft et al., J. Mol. Biol. 292(3) : 513-529

Kim et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. 95 : 2812-2817

5 Klug, 1999, J. Mol. Biol. 293 : 215-218

Krüger et al., 1999, Methods in Enzymology pp207-225

Laird-Offringa et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. 92(25) : 11859-11863

Sizova et al., 1998, J. Virol. 72 : 4775-4782

10 Wolfe et al., 1999, J. Mol. Biol. 285 : 1917-1934

Xu et al., 1997, Structure 5 : 559-570

REVENDICATIONS

1. Procédé de criblage de polypeptides recombinants comprenant au moins un motif de reconnaissance d'ARN (MRR) muté d'une protéine liant naturellement l'ARN, ledit motif étant capable de se lier à la séquence IRES ou l'un de ces domaines d'une molécule d'ARN avec une affinité supérieure ou égale à celle du motif (MRR) de ladite protéine liant naturellement ladite molécule d'ARN, ledit procédé comportant les étapes de :

- a) clonage d'au moins le motif (MRR) de ladite protéine liant naturellement l'ARN.
- b) mutagénèse d'au moins ledit motif (MRR),
- c) expression dudit polypeptide recombinant comprenant au moins le motif (MRR) muté,
- d) détermination de l'affinité dudit motif (MRR) muté dudit polypeptide recombinant pour ladite séquence IRES ou l'un de ses domaines ;
- e) sélection des polypeptides recombinants dont le motif (MRR) muté a une affinité supérieure ou égale à celle du motif (MRR) de ladite protéine liant naturellement l'ARN.

25

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que lesdites étapes b, c et d sont réalisés en mettant en œuvre la technologie de « phage display ».

30

3. Procédé selon les revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que ladite séquence IRES est la séquence IRES d'un ARN viral.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que ledit ARN viral provient de virus à ARN sélectionné dans le groupe des Flaviviridae, des Picornaviridae, des Coronaviridae.

5

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que ledit Flaviviridae est choisi parmi le virus de l'hépatite C, le virus de la diarrhée bovine, le virus de la peste porcine.

10

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que ledit Flaviviridae est le virus de l'hépatite C.

15

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que ladite séquence IRES dudit virus de l'hépatite C a pour séquence SEQ ID N°1.

20

8. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que ledit domaine de la séquence IRES du virus de l'hépatite C est choisie parmi la boucle IIIa de séquence SEQ ID N°2, la boucle IIIb de séquence SEQ ID N°3, la boucle IIIc de séquence SEQ ID N°4.

25

9. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que ladite protéine liant naturellement l'ARN est sélectionnée dans le groupe composé des protéines de maturation de l'ARN et les facteurs régulateurs de la traduction.

30

10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que ladite protéine de maturation de l'ARN est choisie dans le groupe composé de U₁snRNP et eIF3_{p110}.

5 11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que ledit motif de reconnaissance d'ARN (MRR) de ladite protéine eIF3_{p110} est la séquence d'acides aminés 175 à 283 de la séquence SEQ ID N° 5, ou l'un de ses fragments ou leurs variants naturels.

10

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que ledit fragment dudit MRR est la séquence d'acides aminés 185 à 270 de la séquence SEQ ID N° 5.

15

13. Procédé selon les revendications 11 ou 12, caractérisé en ce que ledit MRR eIF3_{p110} ou l'un de ses fragments, ou leurs variants est(sont) muté(s) à au moins une des positions suivantes de la séquence SEQ ID N° 5 :

20

- la valine en position 188,
- le glutamate en position 224 et 225,
- l'aspartate en position 226 et 251,
- la glycine en position 227 et 252,
- la lysine en position 228 et 248

25

- la tyrosine en position 232 et 253,
- la phénylalanine en position 234,
- l'asparagine en position 249,
- l'alanine en position 250.

30

14. Polypeptide recombinant susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13.

15. Polypeptide selon la revendication 14, caractérisé en ce que ledit polypeptide comprend au moins un motif minimal de reconnaissance d'ARN (MRR) fonctionnel.

5

16. Polypeptide selon les revendications 14 ou 15, caractérisé en ce que la séquence dudit polypeptide comprend la séquence d'acides aminés 185 à 270 de la séquence SEQ ID N° 5 mutée à au moins une des positions suivantes :

- la valine en position 188,
- le glutamate en position 224 et 225,
- l'aspartate en position 226 et 251,
- la glycine en position 227 et 252,
- 15 - la lysine en position 228 et 248
- la tyrosine en position 232 et 253,
- la phénylalanine en position 234,
- l'asparagine en position 249,
- l'alanine en position 250.

20

17. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications 14 à 16 à titre de médicament.

18. Polypeptide selon la revendication 17 à titre 25 de médicament pour le traitement de pathologie virale impliquant un virus qui au cours de son cycle de réplication virale met en œuvre une étape de traduction CAP-indépendante d'une séquence d'ARN.

30

19. Polypeptide selon la revendication 18, caractérisé en ce que ledit virus est le virus de l'hépatite C.

20. Utilisation d'un polypeptide selon les revendications 14 à 19 pour la préparation d'un médicament destiné à inhiber la traduction CAP-indépendante d'une région codante d'un ARN.

5

21. Utilisation du polypeptide selon les revendications 14 à 20 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies virales impliquant des virus qui au cours de leur cycle de 10 réplication virale mettent en œuvre une étape de traduction CAP-indépendante d'une séquence d'ARN.

22. Utilisation selon la revendication 21, caractérisée en ce que ledit virus sélectionné parmi 15 les Flaviviridae, les Picornaviridae, les Coronaviridae.

23. Utilisation selon la revendication 22, caractérisée en ce que ledit Flaviviridae est choisi 20 parmi le virus de l'hépatite C, de la diarrhée bovine, de la diarrhée du veau, de la diarrhée humaine, de la peste porcine, de la gastro-entérite transmissible du porcelet, de la fièvre aphteuse, de l'encéphalomyocardite, de l'hépatite A, de l'hépatite 25 de la souris, du rhume, de la bronchite aviaire.

24. Utilisation selon la revendication 23, caractérisée en ce que ledit Flaviviridae est le virus de l'hépatite C.

30

25. Composition pharmaceutique pour le traitement préventif et curatif d'une pathologie choisie parmi

l'hépatite C, la diarrhée bovine, la fièvre aphteuse,
l'encéphalomyocardite, l'hépatite A, le rhume, la peste
porcine, caractérisé en ce qu'elle contient une
quantité thérapeutiquement efficace d'un polypeptide
5 selon les revendications 14 à 19 et un véhicule
pharmaceutiquement acceptable.

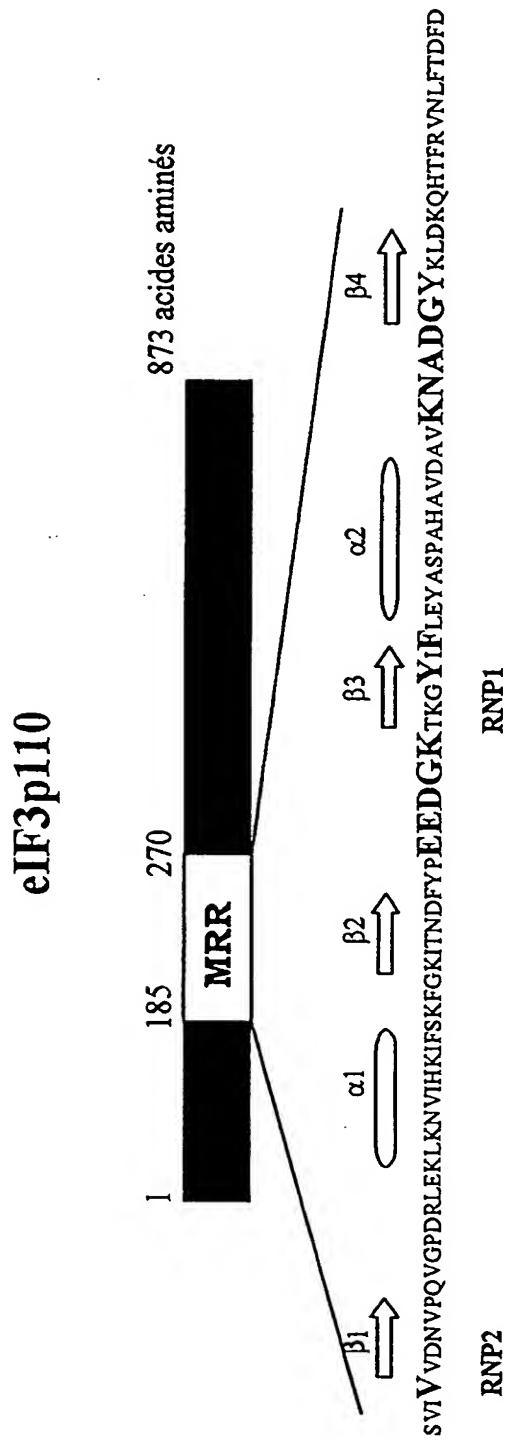


Figure 1

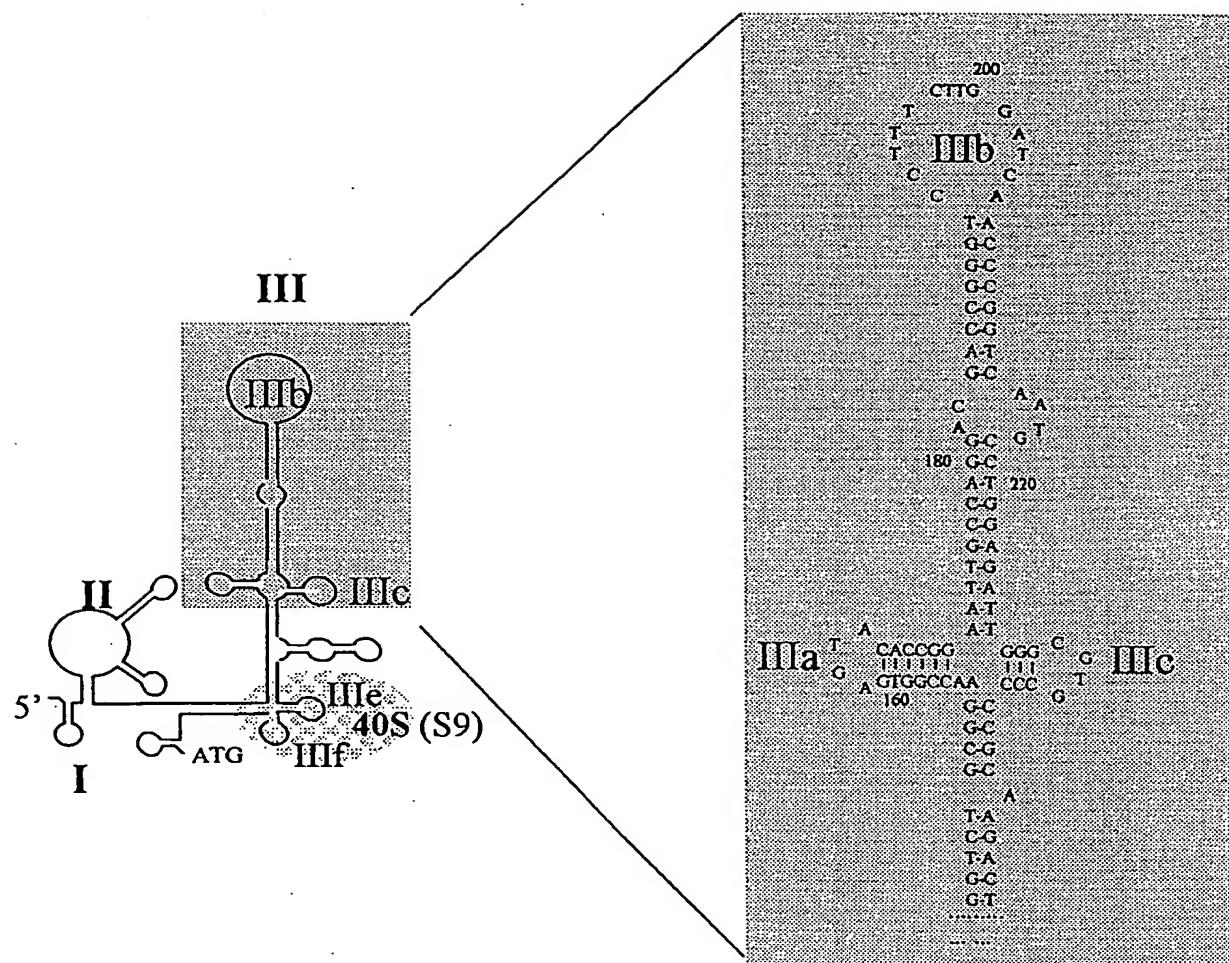


Figure 2

3 / 3

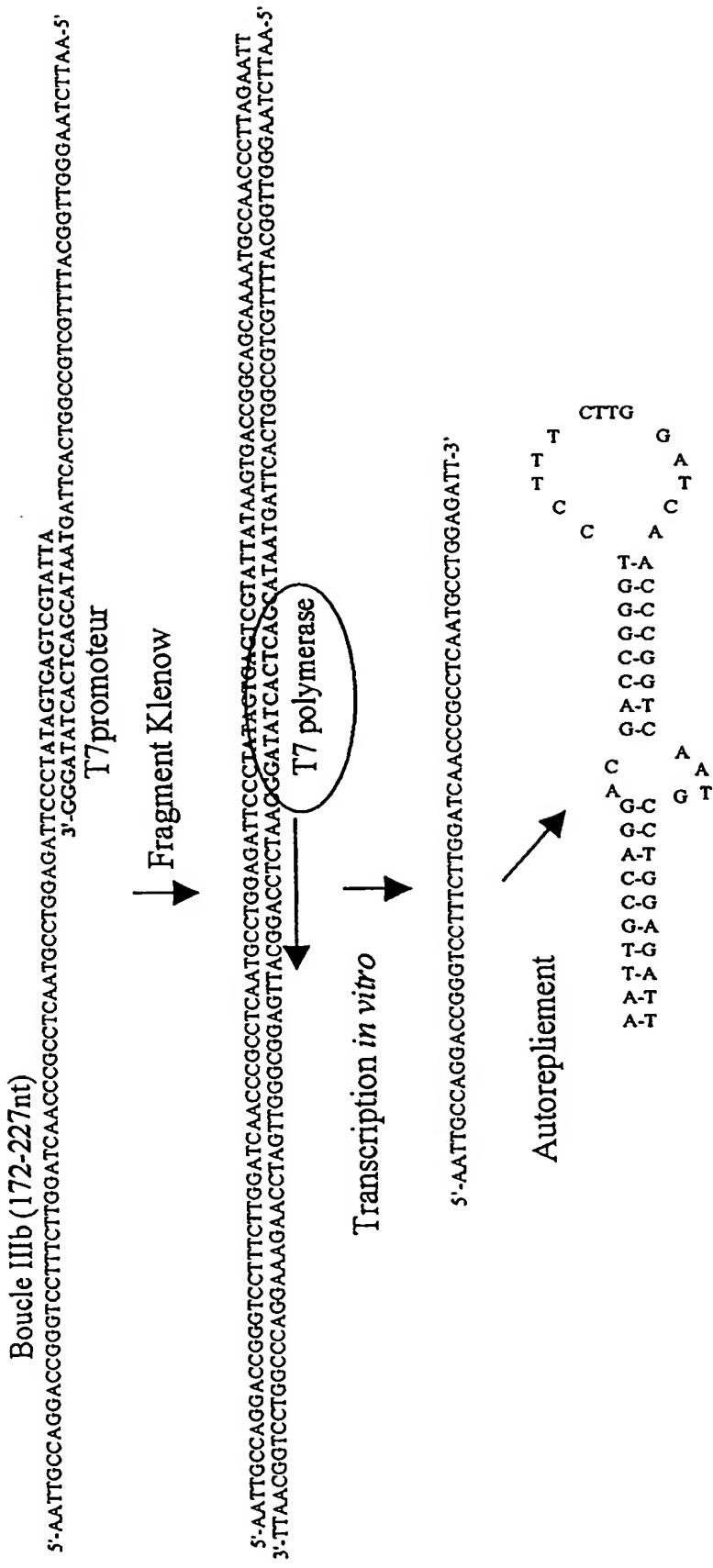


Figure 3